

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-257831

(43)Date of publication of application : 18.10.1990

(51)Int.Cl.

A23J 3/34

A23J 3/16

A23L 1/20

(21)Application number : 01-261630

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 06.10.1989

(72)Inventor : SOEDA TAKAHIKO
NONAKA MASAHIKO
KOBATA HIROKO
ABE HIROKO
TSUCHIYA TOSHIHIRO

(30)Priority

Priority number : 36331056 Priority date : 08.12.1988 Priority country : JP

(54) VEGETABLE PROTEIN POWDER AND PRODUCTION OF BEAN CURD USING THE SAME

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce smooth been cured having great holding power by reacting a vegetable protein-containing aqueous solution with a transglutaminase, providing vegetable protein powder improved in gelation ability, color tone, taste and flavor and using the resultant powder as a raw material.

CONSTITUTION: A reducing agent, such as ascorbic acid, as desired, is added to an aqueous solution containing a vegetable protein, such as soybean protein or wheat protein, and, as desired, further heated to regulate the pH to 5.5-8.0, preferably 5.5-7.0. A transglutaminase in an amount of 0.1-100U, preferably 0.2-50U based on 1g protein is then added to the resultant aqueous solution and preferably reacted therewith at 0-70° C, preferably 20-60° C, heated and dried to afford vegetable protein powder. The obtained soybean protein powder is then used as a raw material, heated at 30-85° C and subsequently coagulated to provide bean curd.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

WILLIAM J. HARRIS

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-257831

⑬ Int. Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)10月18日

A 23 J 3/34

5 0 2

6712-4B

A 23 L 3/16

1 0 4

6712-4B

A 23 L 1/20

Z

7823-4B

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全13頁)

⑮ 発明の名称 植物性タンパク粉末およびそれを用いる豆腐の製造法

⑯ 特 願 平1-261630

⑰ 出 願 平1(1989)10月6日

優先権主張 ⑱ 昭63(1988)12月8日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭63-310566

⑳ 発 明 者 添 田 孝 彦 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

㉑ 発 明 者 野 中 雅 彦 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

㉒ 発 明 者 木 幡 浩 子 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

㉓ 発 明 者 阿 部 宏 子 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

㉔ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

植物性タンパク粉末およびそれを用いる豆腐の製造法

2. 特許請求の範囲

(1) pHが5.5-8.0である植物性タンパク含有水溶液にタンパク1g当りトランスグルタミナーゼを0.1-100U添加し、温度0-70℃で作用させた後加熱し、次いで乾燥してなる植物性タンパク粉末。

(2) 植物性タンパク含有水溶液が加熱されたものである請求項(1)記載の植物性タンパク粉末。

(3) 植物性タンパク含有水溶液が大豆タンパク含有水溶液で、かつ植物性タンパク粉末が分離大豆タンパク粉末である請求項(1)または(2)記載の植物性タンパク粉末。

(4) 植物性タンパク含有水溶液が大豆タンパク含有水溶液で、かつ植物性タンパク粉末が豆乳粉末である請求項(1)または(2)記載の植物性タンパク粉末。

(5) 植物性タンパク含有水溶液に還元剤を添加することを特徴とする請求項(1)乃至(4)記載の植物性タンパク粉末。

(6) 請求項(1)乃至(5)記載の植物性タンパク粉末のうち、大豆タンパク粉末を原料として、かつ30-85℃で加熱後、凝固することを特徴とする豆腐の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はトランスグルタミナーゼ(以下 TGaseと略記する。)を利用して改質された植物性タンパク粉末、およびその植物性タンパク粉末のうち、大豆タンパク粉末を原料として用いる豆腐の製造法に関するものである。

(従来技術とその課題)

従来より、かまぼこ、ちくわ、揚げかま、ソーセージ、ハムなどの魚肉・畜肉製品は原料価格の変動が激しく、コストを安定させるために大豆タンパクに代替される植物性タンパクを使用することが行われている。しかしながら、大豆タンパク

特開平2-257831 (2)

に代表される植物性タンパクは、その物性・臭い・色調の点で動物性タンパクとなじみにくく、未だ充分に満足できる品質特性のものは得られていない。

この様な理由から、従来得られている植物性タンパクの前記の様な製品への利用は、固形分換算で通常、製品全体の1-1.5%多くても3%程度の使用にとどまっている。

一方、古来より伝統的な食品として豆腐があるが、この製造法としては丸大豆より豆乳を得、これに凝固剤を加える方法で作られている。従来よりこの豆乳を得るまでに半日、季節によっては1日以上を要し、豆腐製造の律速段階となっていた。また、近年これを解決すべく、粉末豆乳（豆腐粉ともいうが、ここでは豆乳粉末という用語を用いる。）の開発が試みられ、いくつかの商品も見受けられる。しかしながら、これらはいずれも従来法で作られた豆乳の濃度調節に用いられる場合が多い。また、これらは乾燥および粉末化の過程で受ける変性が大きく、これ単独から得られた豆乳

で豆腐を作る場合、いわゆる充填豆腐は可能なものの、保水力が小さく、凝固状態が非常に悪いため、木綿ごし豆腐などは作ることができなかった。さらに豆腐の製造工程では凝固前に必ず豆乳を沸騰させる必要があった。

そこで、本発明の目的は物性・臭い・色調の改善された植物性タンパクを提供し、また大豆タンパクにおいては、保水力の高く、しかもなめらかであるという特徴をもつ各種豆腐（木綿ごし・絹ごし・充填）を容易に製造することのできる豆乳粉末を提供することである。

（課題を解決するための手段）

本発明者らは前記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、植物性タンパク含有水溶液に、TGaseを作用させることによりゲル化能が改善され、また色調・味・風味も改善された植物性タンパク粉末をしかも高収率で得ることができ、また同様な方法により大豆タンパク水溶液から、保水力の高く、なめらかであるという特徴をもつ各種豆腐（木綿ごし・絹ごし・充填）を沸騰過程を経

ずに製造することのできる豆乳粉末が得られることを見だし、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

本発明において用いられる植物性タンパクとしては、大豆タンパク、小麦タンパク、トウモロコシタンパク、米タンパクを例示することが出来る。この様な植物性タンパクを含有する水溶液としては、植物性タンパクが例えば大豆タンパクの場合は、濃縮タンパク、分離タンパクなどを製造する工程中に生ずるタンパク含有水溶液をそのまま使用するか、類似の方法で調整したものを使用するとよい。もちろん丸大豆の加水磨砕物や豆乳なども使用に適している。他の植物性タンパクの場合も当業者であればそれを含有する水溶液を調整することは容易である。

通常、分離大豆タンパクは、例えば次の様に製造される。1-(1)脱脂大豆を温度40-70℃、pH6-8において7-15重量部の水で水抽出する。pHの調整が必要ならばH₂SO₄、HCl、H₃PO₄などの食品級酸、またはNaOHなどの食品級

アルカリを使用するとよい。抽出処理物からデカンター、遠心分離機などによりオカラを分離して抽出液を得る。1-(2)この抽出液をH₂SO₄、HCl、H₃PO₄などの酸を使用するタンパクの等電沈殿処理に付する（pH4.5付近）。処理後デカンター、遠心分離機などによりホエイを分離してタンパクカードを得る（固形分30-35%）。1-(3)5-10重量部の水を加えてこのカードをディスポーザー、ミキサー、攪拌機などにより解砕してタンパクスラリーを調整し（タンパク含量2-5%）、ついで得られたスラリーは所望によりNaOHなどにより中和して中和スラリーとする（通常はpH7）。1-(4)タンパクの腐敗を防止するために殺菌し、併せてこれにゲル化性、乳化性、泡立ち性などの機能性を付与して品質特性を改善するために中和し、またはしないタンパクスラリーをエジェクタータイプの加熱機などにより加熱し（70-200℃）、次いで噴霧などにより乾燥して（ドライヤー入口温度130-200℃）、目的たる分離大豆タンパクが得られる。

特開平2-257831 (3)

また、豆乳粉末は例えば次の様にして得られる。
2-(1)丸大豆1重量部を室温で12時間水に浸漬し、次いで水を9重量部となる様に加え、ミキサーなどで磨砕する。2-(2)この磨砕液を100℃まで加熱し2-3分沸騰状態を保つ。2-(3)次いでデカンター、遠心分離機などによりオカラを分離して豆乳が得られる。2-(4)工程1-(4)と同様の目的方法で加熱し、乾燥して目的の豆乳粉末が得られる。

本発明の植物性タンパク粉末は、上記工程1-(3)のタンパクスラリー（これは本発明に謂う植物性タンパク含有水溶液に包含される。）、上記工程1-(1)の抽出液（これは本発明に謂う植物性タンパク含有水溶液に包含される。）、上記工程2-(1)の加水磨砕物（これは本発明に謂う植物性タンパク含有水溶液に包含される。）および上記工程2-(3)の豆乳（これは本発明に謂う植物性タンパク含有水溶液に包含される。）を使用して得ることができる。つまり本発明で用いられる植物性タンパク含有水溶液は、未加熱であっても加熱され

たものであってもよい。

植物性タンパク含有水溶液に対してTGaseを作用させるということは、より詳しくはTGaseのタンパク架橋能を活用し、タンパクをTGaseにより架橋化することであるが、その作用条件は次の通りである。

本発明で使用するTGaseの起源は特に問わず、例えばモルモットの肝臓から分離したもの（以下、MTGaseと略記する。）、微生物が産生するもの（以下、BTGaseと略記する。）、更には天然物、例えば野菜、果実などの水抽出液等、魚類など水産物の抽出液および洗浄液等に含有されるものを挙げることができる。MTGaseは、たとえば特開昭58-14964号に記載の方法で調整することができる。BTGaseは、新規酵素であって、特開平1-27471に係わるもので、その酵素特性、製造法等については別項に記載する。

TGaseの使用量は、タンパク1g当り0.1-100U、好ましくは0.2-50Uである。使用量が少なすぎると得られる植物性タンパク粉末に

ゲル化促進効果はみられず、TGase非使用の場合（対照）に対して差がみられず、一方多すぎるとやはりゲル化促進効果がみられず、形成したゲルはもろくなり、かつ色調・臭いの点でも改善効果がみられず、不適である。

pHに関しては、5.5-8.0、好ましくは5.5-7.0、さらに好ましくは、5.7-6.5の範囲である。pHが低すぎるとゲル化促進効果がでず、TGase非使用の場合（対照）と差がなく、高すぎるとゲル化促進効果は大となるものの、色調・臭いの改善がみられない。

温度は0-70℃で、好ましくは20-60℃の範囲である。低すぎると長時間の処理時間が必要であり、高すぎると架橋反応が速すぎて反応のコントロールが困難である。

植物性タンパク含有水溶液におけるタンパク含量（濃度）は特に問題とならないが、通常4-15重量%の範囲が採用される。もちろん上記範囲に限定されるわけではない。

この様な作用条件で処理すると1分乃至3時間

で適度な架橋化が起こる。

前記の様な通常の分離大豆タンパク製造工程の工程1-(3)の中和タンパクスラリーまたは工程1-(1)の抽出液を植物性タンパク含有液として採用して本発明方法を実施する場合、該前記通常の分離大豆タンパク製造工程の工程1-(3)または工程1-(1)において前述の条件でTGaseを作用させて改変を加える以外は全く通常の分離大豆タンパクを調整するのと同じ方法により改良された分離大豆タンパクが得られる。因みに、TGaseは中和タンパクスラリー、抽出液のいずれに作用させてもよいが、作用後のタンパクの分離操作性や最終製品の収率などの点から、中和タンパクスラリーにTGaseを作用させて本発明の植物性タンパク粉末を得るのが好ましい。特に上記の様な従来の分離大豆タンパク製造工程における工程1-(3)で本法を実施すると、実施しない場合に比較して最終分離大豆タンパクの収率の向上が顕著である。

また、豆乳の製造工程においては、工程2-(1)の加水磨砕物および工程2-(3)の豆乳、いずれに

特開平2-257831 (4)

TGaseを作用させてもかまわない。しかしながら、得られた豆乳粉末を豆腐製造の目的に使用する場合には、工程2-(3)の豆乳にTGaseを作用させた方がより好ましいものとなる。

さらに、植物性タンパク含有水溶液に還元剤を添加すると、豆腐製造の際保水力が高くなる。このときの還元剤は前記工程中の工程1-(4)および工程2-(4)以前であればいずれの段階で添加してもよい。また添加量としては使用する還元剤によっても異なり、一概に決めることはできないが、5%以下の使用で充分である。還元剤としては、アスコルビン酸等食品に添加の認められているものであれば、いずれも使用することができ、残存濃度の定められているものであれば、それに従って使用すればよい。

植物性タンパク含有水溶液にTGaseを作用させた後に加熱するが、これはタンパクの腐敗防止のための殺菌と併せて、目的の植物タンパクの機能性を付与するためである。この目的からは、加熱温度は70-200℃がよく、色調・ゲル化性・

臭いの面から好ましくは100-150℃である。加熱温度が70℃以下ではタンパクの改質とTGaseの失活が不十分であり、200℃以上では臭いが強くなって不適である。加熱は直接もしくは間接加熱を用い、例えば牛乳の殺菌などに用いられるプレート式瞬間短時間加熱機を使用して行うことができる。もちろん上記以外の方法を用いてもかまわない。

次いで行う乾燥は、その条件は特に制限されるものではないが、所望の機能性を付与されたタンパクが更に変性を受けるような温度などの条件を避けるべきことはもちろんで、通常ドライヤーの入口温度130-200℃の温度でノズルタイプやディスクタイプのスプレードライヤーなどを用いて行うことができる。もちろん凍結真空乾燥も差し支えない。

前記の様な通常の分離大豆タンパクおよび豆乳粉末製造工程内で生ずる中和タンパクスラリー、抽出液を原料として、本発明にかかる植物性タンパク粉末を得る場合には、通常の製造工程1-(4)

および2-(4)における加熱、乾燥の条件をほとんどそのまま本発明に適用することができる。

以上、本発明を分離大豆タンパクおよび豆乳粉末に関連させて説明したが、もちろん本発明はこれに限られるものでないということは当業者であれば容易に理解できよう。つまり、高純度小麦タンパク、高純度米タンパクなども本法により機能性を付与したものが得られる。更にまた、従来法で一旦製造して得た分離大豆タンパク、濃縮大豆タンパクなどを本法の植物タンパクとして採用し、これに本法を実施すれば、そのような分離大豆タンパク、濃縮大豆タンパクなどに所望の特性を付与することもでき本発明品を範中に入る。

また、本発明の豆乳粉末で豆腐を製造する際には、凝固剤を特に選ぶことなく、現在行われているあらゆる方法での豆腐製造はもちろん可能であるが、本発明の特徴として、凝固温度(通常70-80℃)まで、即ち30-85℃で加熱すればよいところにある。つまり、凝固前に豆乳液を沸騰させる必要がなくとも、保水力が高くしかも非

常になめらかな豆腐が得られる点にある。もちろん本発明で得られた豆乳粉末を原料にして、通常通り凝固前に豆乳液を100℃まで沸騰させてもよい。この場合も原料として本発明に係わる豆乳粉末を用いているので、非常に高品質の豆腐を得ることができる。

特開平1-27471号公報にも開示されているが、一応念の為に新規トランスグルタミナーゼBTGaseを説明しておく。

(新規トランスグルタミナーゼBTGase)

(1) トランスグルタミナーゼとその由来

トランスグルタミナーゼ(TGase)は、ペプチド鎖内にあるグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。このTGaseは、アシル受容体としてタンパク質中のリジン残基の ϵ -アミノ基が作用すると、分子内及び分子間に $\epsilon-(\gamma\text{-Glu})\text{-Lys}$ 架橋結合が形成される。また水がアシル受容体として機能するときは、グルタミン残基が脱アミド化されグルタミン酸残基になる反応を進行させる酵素である。

特開平2-257831 (5)

IGaseのこのような性質により、IGaseを用いてタンパク含有溶液又はスラリーをゲル化させることができる。

IGaseは、これまでモルモット肝由来のもの(MTGase)などの動物由来のものが知られているが、動物由来のものは、安価にまた大量に入手するのが困難であり、タンパク質をゲル化するときには酵素濃度および基質濃度を共に高くする必要があり、またCa²⁺依存性であるので用途が制限される。

本発明で使用する新規トランスグルタミナーゼ(BTGase)は、微生物、例えば、ストレプトベルチシリウム属の菌により産生されるものであるが、微生物由来のIGaseについての報告は現時点ではない。

本発明で使用する微生物由来のBTGaseは安価に供給され、かつ精製も容易であるので実用性が大である。また、BTGaseを用いることにより、カルシウム非存在下又カルシウム存在下のいずれでも酵素(BTGase)濃度及び基質濃度が非常に低い

ところで品質の優れたゲル化物を製造できるという利点がある。

(2) BTGaseの製造

BTGaseを産生する微生物は、例えば、ストレプトベルチシリウム・グリセオカルネウム(*Streptovercillium griseocarneum*)IFO 12776、ストレプトベルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウム(*Streptovercillium cinnamomeum sub sp cinnamomeum*) IFO 12852、ストレプトベルチシリウム・モバラエンス(*Streptovercillium mobaraense*) IFO 13819等が挙げられる。

これら微生物を培養し、トランスグルタミナーゼを取得するための培養法及び精製法等は次の通りである。

培養形態としては、液体培養、固体培養いずれも可能であるが、工業的には深部通気攪拌培養を行うのが有利である。又、使用する培養源としては、一般に微生物培養に用いられる炭素源、窒素源、無機塩及びその他の微量栄養源の他、ストレ

プトベルチシリウム属に属する微生物の利用出来る栄養源であれば全て使用出来る。培地の炭素源としては、ブドウ糖、ショ糖、ラクターゲン、グリセリン、デキストリン、澱粉等の他、脂肪酸、油脂、有機酸などが単独で又は組合せて用いられる。窒素源としては、無機窒素源、有機窒素源のいずれも使用可能であり、無機窒素源としては硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸ソーダ、塩化アンモニウム等が挙げられる。又、有機窒素源としては大豆、米、トウモロコシ、小麦などの粉、糖、脱脂粕をはじめコーンステイアブリカー、ペプトン、肉エキス、カゼイン、アミノ酸、酵母エキス等が挙げられる。無機塩及び微量栄養素としては、リン酸、マグネシウム、カリウム、鉄、カルシウム、亜鉛等の塩類の他ビタミン、非イオン界面活性剤、消泡剤等の菌の生育やBTGaseの産生を促進するものであれば必要に応じて使用出来る。

培養は好気的条件下で、培養温度は菌が発育しBTGaseが産生する範囲であれば良く、好ましくは

25〜35℃である。培養時間は、条件により異なるが、BTGaseが最も産生される時間まで培養すれば良く、通常2〜4日程度である。

BTGaseは液体培養では培養液中に溶解されており、培養終了後培養液より固形分を除いた培養液より採取される。

培養液よりBTGaseを精製するには、通常酵素精製に用いられるあらゆる方法が使用出来る。

例えば、エタノール、アセトン、イソプロピルアルコール等の有機溶媒による処理、硫酸、食塩等により塩析、透析、限外ろ過法、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過、吸着剤、等電点分画等の方法が使用出来る。又、これらの方法を適当に組合せる事によりBTGaseの精製度が上がる場合は適宜組合せて行う事が出来る。これらの方法によって得られる酵素は、安定化剤として各種の塩類、糖類、蛋白質、脂質、界面活性剤等を加え或いは加えることなく、限外ろ過濃縮、逆浸透濃縮、減圧乾燥、凍結乾燥、噴霧乾燥の方法により液状又は固形のBTGaseを得る

特開平2-257831 (6)

ことが出来る。

BTCaseの活性測定はベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンニルグリシンとヒドロキシルアミンを基質として Ca^{2+} 非存在下で反応を行い、生成したヒドロキサム酸をトリクロロ酢酸存在下で鉄錯を形成させ525nmの吸収を測定し、ヒドロキサム酸の量を検量線より求め活性を算出する。

BTCase活性は、特に記載しないかぎり以下に記載する方法により測定した。

<活性測定法>

試薬A 0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 6.0)

0.1 M ヒドロキシルアミン

0.01 M 還元型グルタチオン

0.03 M ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンニルグリシン

試薬B 3 N-塩酸

12% -トリクロロ酢酸

5% $\text{Fe} \text{ m m } \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0.1 N-H m m に溶解)

上記溶液の1:1:1の混合液を試薬Bとする。

酵素液の0.05 m l に試薬A 0.5 m l を加えて混合し37℃で10分間反応後、試薬Bを加えて反応停止とFe錯体の形成を行った後525nmの吸光度を測定する。対照としてあらかじめ熱失活させた酵素液を用いて同様に反応させたものの吸光度を測定し、酵素液との吸光度差を求める。別に酵素液のかわりにL-グルタミン酸γ-モノヒドロキサム酸を用いて検量線を作成し、前記吸光度差より生成されたヒドロキサム酸の量を求め、1分間に1μモルのヒドロキサム酸を生成する酵素活性を1単位とした。

(3) BTCaseの酵素特性

上のようにして得られる精製BTCase、即ちストレプトベチシリウム・モバランスIFO 13819 のトランスグルタミナーゼ(BTG-1と命名)、ストレプトベチシリウム・グリセオカルネウムIFO 12776 のトランスグルタミナーゼ(BTG-2と命名)、ストレプトベチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウムIFO 12852 のトランスグルタミナーゼ(BTG-3と命名)についての酵素化学

的性質は次の通り。

a) 至適pH:

基質としてベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンニルグリシンとヒドロキシルアミンを使用した場合、37℃、10分反応で、BTG-1の至適pHは6~7にあり、BTG-2の至適pHは6~7付近にあり、BTG-3の至適pHは6~7付近にある。

b) 至適温度:

基質としてベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンニルグリシンとヒドロキシルアミンを使用した場合、pH 6、10分反応で、BTG-1の至適温度は55℃付近であり、BTG-2の至適温度は45℃付近であり、BTG-3の至適温度は45℃付近にある。

c) pH安定性:

37℃、10分間処理で、BTG-1はpH 5~9で安定であり、BTG-2はpH 5~9であり、BTG-3はpH 6~9で安定である。

d) 温度安定性:

pH 7で10分間処理では、BTG-1は40℃では

88%活性が残存し、50℃では74%活性が残存し、BTG-2は40℃では86%活性が残存し、50℃では56%活性が残存し、BTG-3は40℃で80%活性が残存し、50℃では53%活性が残存する。

e) 基質特異性:

各BTCaseを用い、各種合成基質とヒドロキシルアミンとの反応を調べた。いずれのBTCaseも合成基質がベンジルオキシカルボニルアスパラギニルグリシン、ベンジルオキシカルボニルグルタミルグリシルグルタミンニルグリシンの場合反応しない。しかし合成基質がベンジルオキシカルボニルグルタミンニルグリシンの場合の反応性は最も高い。この時の各種合成基質濃度は5mMとした。結果は表-1に示される。

なお、表-1中のCBZはベンジルオキシカルボニル基の略であり、Glnはグルタミンニル基の略であり、Glyはグリシル基の略であり、Aspはアスパラギニル基の略である。

特開平2-257831 (7)

表-1

基 質	BTG-1	BTG-2	BTG-3
	%	%	%
CBZ-Gln-Gly	100	100	100
CBZ-Gln-Gly-oEt	63	44	42
CBZ-Gln-Gln-Gly	38	39	35
CBZ-Gly-Gln-Gly-Gly	8	12	11
CBZ-Gly-Gly-Gln-Gly	23	58	60
CBZ-Gln	0	0	0
CBZ-Asp-Gly	0	0	0
Gly-Gln-Gly	0	0	0

f) 金属イオンの影響:

活性測定系に1mM濃度になるように各種金属イオンを加えて影響を調べた(結果は表-2に示される)。いずれのBTGaseも Cu^{2+} 、 Zn^{2+} により活性が阻害される。

表-2

金属イオン	BTG-1	BTG-2	BTG-3
	%	%	%
None	100	100	100
CaCl_2	101	102	102
BaCl_2	101	99	105
CoCl_2	103	103	103
CuCl_2	79	82	86
FeCl_2	96	104	106
KCl	96	99	105
MgCl_2	102	104	103
MnCl_2	98	97	97
NaCl	99	102	101
NiCl_2	102	100	101
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	97	97	100
SrCl_2	100	101	100
ZnCl_2	15	24	24

g) 阻害剤の影響:

各阻害剤を1mMになるように加え、25℃、30分放置後、活性を測定した(結果は表-3に示される)。いずれのBTGaseもパラクロロマーキュリー安息香酸(PCMBと略する)、N-エチルマレイミド(NEMと略する)、モノヨード酢酸により活性が阻害される。

表-3

阻 害 剤	BTG-1	BTG-2	BTG-3
	%	%	%
None	100	100	100
EDTA	102	98	99
PCMB	54	61	63
NEM	5	5	3
モノヨード酢酸	64	50	67
PMSP	104	95	101

表-3中PMSPはフェニルメチルスルホニルフルオリドの略である。

h) 等電点:

アンホライン等電点電気泳動により求めたところ、BTG-1の等電点pIは9付近であり、BTG-2の等電点pIは9.7付近であり、BTG-3の等電点pIは9.8付近である。

i) 分子量:

SDSディスク電気泳動法より求めたところ、BTG-1の分子量は約38,000であり、BTG-2の分子量は約41,000であり、BTG-3の分子量は約41,000である。

j) MTGaseとの比較:

次にBTGaseとモルモット肝由来のトランスグルタミナーゼ(MTGase)との性質を比較する。尚、MTGaseは、特開昭58-149645号に記載された方法で調製した。

表-4には各酵素化学的性質の比較を、表-5には Ca^{2+} の活性に及ぼす影響を示す。表-4および表-5より明らかのように従来主として研究されているMTGaseとの放線菌由来のBTGaseとは酵素化学的性質において種々の差が見られ、特に温

特開平2-257831 (8)

度安定性、分子量、等電点、基質特異性に差が見られる。また、 Ca^{2+} の存在下及び非存在下においてもBTGaseは作用する点等でもMTGaseとは明らかな差がみられる。従って、BTGaseの各酵素はMTGaseとはその性質を異にするものと考えられる。

表-4

	BTG-1	BTG-2	BTG-3	MTGase
至適pH	6~7	6~7	6~7	6
pH安定性	5~9	5~9	6~9	6~7.5
至適温度	55℃付近	45℃付近	45℃付近	50~55℃
温度安定性(%)	88	86	80	96
40℃残存率	74	56	53	40
50℃残存率	約38,000	約41,000	約41,000	約90,000
分子量	9.0	9.7	9.8	4.5
等電点	100	100	100	100
基質特異性(%)				
C82-Gln-Gly	63	44	42	122
C82-Gln-Gln-Gly	38	39	35	288
C82-Gly-Gln-Gly-Gly	8	12	11	126
C82-Gly-Gly-Gln-Gly	23	58	60	27

表-5

金属イオン	BTG-1	BTG-2	BTG-3	MTGase
	%	%	%	%
None	99	98	100	0
1mM CaCl ₂	100	100	99	39
5mM CaCl ₂	100	100	98	100

(4) BTGaseの製造例

a) BTG-1の製造

ストレプトベルチシリウム・モバラエンス IF013819を培地組成ポリペプトン0.2%、グルコース0.5%、リン酸二カリウム0.2%、硫酸マグネシウム0.1%からなる培地(pH7)200mLに接種し、30℃で、48時間培養し、得られた種培養液をポリペプトン2.0%、ラスターゲン2.0%、リン酸二カリウム0.2%、硫酸マグネシウム0.1%、酵母エキス0.2%、消泡剤としてアデカノール(商品名、旭電化社製品)0.05%からなる培地20L(pH7)に加え30℃で3日間培養後ろ過し、培養液18.5L得た。このものの活性は、

0.35 U/mLである。

培養液を塩酸でpH6.5に調整し、予め0.05Mリン酸緩衝液(pH6.5)で平衡化しておいたCG-50(商品名、オルガノ社製品)のカラムに通した。この操作でトランスグルタミナーゼは吸着された。さらに同緩衝液で不純蛋白質を洗い流した後、さらに0.05~0.5Mの同緩衝液の濃度勾配をつくり、通液して溶出液を分画回収し、比活性にの高い分画を集めた。電導度を10ms以下になるように希釈後ブルーセファロースのカラムに通した。この操作でトランスグルタミナーゼは吸着された。更に0.05Mリン酸緩衝液(pH7)で不純蛋白質を洗い流した後、0~1Mの食塩濃度勾配をつくり通液して溶出液を回収し非活性の高い分画を集めた。UF6000膜を使い濃縮し、0.5Mの食塩を含む0.05Mリン酸緩衝液(pH7)で緩衝を用いて平衡化させた。

得られた濃縮液を同緩衝液で予め平衡化しておいたセファデックスG-75(ファルマシアファインケミカル社製)を含むカラムに通し、同緩衝

特開平2-257831 (9)

液を流して溶出液を分画した。この結果活性画分は単一のピークとして溶出された。このものの比活性は、培養液に対し625倍であり、回収率は47%であった。

b) BTG-2 の製造

BTG-1 の場合と同様にして、ストレプトベルチシリウム・グリセオカルネウムIFO 12776 を30℃で3日間培養後ろ過し、培養液19Lを得た。このものの活性は0.28 U/mLであった。

BTG-1 の場合と同様な方法で酵素を精製して、SDSディスク電気泳動で単一の酵素を得た。

c) BTG-3 の製造

BTG-1 の場合と同様にして、ストレプトベルチシリウム・シナモノネウム・サブ・エスピー・シナモノネウムIFO 12852 を30℃で3日培養後ろ過し、培養液18.5Lを得た。このものの酵素活性は0.5 U/mLであった。

BTG-1 の場合と同様な方法で酵素を精製して、SDSディスク電気泳動で単一の酵素を得た。

以下、本発明を実施例により更に説明する。

実施例1

脱脂大豆（米国イリノイ州産大豆を剥皮後室温でn-ヘキサンで抽出して得たもの）を9重量倍の水に添加した。該混合物のpHは6.4であった。これに水酸化ナトリウムを加えてpH7.0に調整後40℃で30分間攪拌してタンパクの抽出を行った。抽出処理物からスーパーデカンターによりオカラを除去して抽出液を得た。

この抽出液のpHをaq. H_2SO_4 にて4.5に調整してタンパクを等電沈降させ、スーパーデカンターによりホエイを除去してタンパクカード乾物（固形分31%）を得た。

カード乾物当り8重量倍の水を加えてディスパーズミルにより解砕してタンパクスラリーとし、NaOHを用いてpH5.0、5.5、6.0、6.5及び7.0の5種の中和タンパクスラリーを調製した（前からサンプルNo.1～No.5と称する。）。各サンプルのタンパク含量は3.2重量%前後であった。

サンプルNo.1～5にタンパク1g当りBTGase（BTG-1、比活性1.9 U/mg）を0.1、1、10、

100、及び200 Uとなるようにそれぞれ添加し室温（25℃）で30分間保持して、TGaseを作用させた。

このようにしてTGaseを作用させた各サンプル（各タンパクスラリー）をエジェクター類似混合管にて高温蒸気吹込みにより120℃で10秒間保つ加熱をし、次いで600 mmHg程度の減圧に保持してあるサイクロン内に噴出し、急速に60℃に冷却した。

このものを噴霧乾燥（約160℃）することにより5種類の大豆タンパク粉末を得た。

因みに、上記大豆タンパク粉末についてゲル化能の評価を次のようにして、行なった。

(1) ゲル調製法

大豆タンパク粉末100gに水350ccを加え、攪拌機により15分間混練し、この混練物を非可食性ケーシングチューブ（折幅47mm）に充填した。次いで、90℃の熱水中で50分間加熱後、水道水にて常温まで冷却することにより、評価用ゲルを調製した。

(2) ゲル強度の測定

ゲルを厚さ30mmに輪切にしたものを用い、不動工業製レオメーターにて、プランジャーは7mmφの球を用いて得られたゲル強度（kg）をゲルの表面積（cm²）で割った値（kg/cm²）を表示した。

(3) 官能評価

ゲルを厚さ5mmに輪切にしたものを用い、パネル数10名（男5名、女5名）により、10点法にて、色調と臭いを評価した。

評価基準：10…非常にすぐれている、8…かなりすぐれている、5…普通（対照、pH7、BTGase不使用）、3…かなり劣る、0…非常に劣る。

上記の結果を表-6にまとめて示す。

表 5

処理条件 pH	BTGase (U/g)	大豆抽出液 (g/ml)	官能評価		総合的にみたゲル評価及びコメント
			色	臭い	
5	0	0.50	7.0	5.8	共にゲルは白いが、きめが粗く、ゲル化能も弱く、不遇。
	1	0.53	7.1	6.0	
	0	0.71	8.7	6.5	ゲル化能少し改善
	0.1	0.74	8.7	6.5	ゲル化能強く、色調、臭いは良好。
5.5	1	1.22	8.9	8.1	同上。
	10	1.28	9.0	8.4	同上。
	100	1.15	9.1	7.8	ゲル化能やや強い。色調、臭いは良好。
	200	0.75	9.1	6.0	ゲル化能弱く、ざらつく。
6	0	0.98	8.0	7.1	ゲル化能強い。色調、臭いは良好。
	1	1.50	8.5	8.4	
	0	1.22	6.0	5.5	ゲル化能少し改善。
	0.1	1.30	6.2	5.8	ゲル化能強く、色調、臭いは良好。
6.5	1	2.01	6.4	6.6	同上。
	10	1.93	6.4	7.0	同上。
	100	1.70	6.5	7.3	ゲル化能やや強く、色調、臭いは良好。
	200	1.20	6.7	7.0	ゲル化能強い。
7	0	1.51	5.0	5.0	(対照)
	1	2.55	5.5	5.3	ゲル化能強いが、少し臭いがある。

急速の50℃にて冷却した。このものを凍結真空乾燥し、さらにミキサーにて粉末化し5種類の豆乳粉末を得た。

因みに、上記豆乳粉末について、次の様に豆腐を調整し、評価を行った。

(1) 豆腐の調整方法

豆乳粉末60gに水940gを加え、ミキサーにて溶解させた。その後、100℃まで加熱し、80℃まで冷却した豆乳に0.4重量%となる様、少量の水で溶いた硫酸カルシウムを加えて10分間静置した。このものを木綿さらし布を敷いた豆腐型箱に流し込み、重石をのせて20分間水切りをして、ゆを除き豆腐を得た。

(2) 豆腐の評価方法

(1)の方法で調整した豆腐について、以下の評価を行った。

- ①豆腐の保水力・・・水切りの際、出てくるゆの量を測定し、少ないほど保水力が高いと判断した。
- ②豆腐の凝固性・・・水切りの際出てくるゆの透過率を測定した。(タンパクが凝固していないと、

特開平2-257831 (10)

本発明の方法により低pH、例えばpH5.5～6.5で処理すれば、ゲル強度を維持したまま、色調、味、風味も改善された植物性タンパク粉末が得られた、またこのタンパク粉末のゲル形成能は、TGase不使用の場合に較べて、1.5～2.0倍にも達する。

実施例2

全脂大豆フレーク(米国イリノイ州産大豆を剥皮後圧扁したもの)に9重量倍の水を加え、ミキサーにて攪拌し、大豆スラリーを得た。このものを100℃で2～3分加熱し、その後遠心分離機にてオカラを除去し、豆乳を得た。

次に、この豆乳にタンパク1g当りBTGase (BTG-1 比活性1100 U/g)を0.1, 1, 10, 20および100Uとなる様にそれぞれ添加し、50℃にて30分間保持して、TGaseを作用させた。この様にしてTGaseを作用させた豆乳をエジェクター類似混合管にて高温蒸気吹き込みにより、120℃で4秒間保つ加熱をし、次いで600mmHg程度の減圧に保持してあるサイクロン内に噴出し、

ゆが白く濁るので透過率は低くなる。従って数値は高いほど良い。))

③官能評価・・・豆腐の凝固状態や食感について、官能評価を行った。

上記の結果を表-7にまとめて記す。

表 - 7

処理条件 BTCase (U)	豆腐の保水力 ゆの量 (g)	豆腐の凝固率 ゆの透過率 (%)	官能評価
0	260	97.1	やや粉っぽくモロモロの凝固物
0.1	255	97.8	凝固状態が改善されなめらかさが でてくる
1	250	97.8	
10	240	98.1	非常になめらかで市販の豆腐とほ ぼ同様の食感
20	230	98.1	
100	255	98.5	なめらかさがある
市販豆腐粉	270	85.9	粉っぽく臭いが悪い

粉末を得た。

これらの豆乳粉末について、実施例2と同様に、
豆腐を調整し、評価を行った。

上記の結果を表-8にまとめて記す。

表 - 8

処理条件 BTCase (U)	豆腐の保水力 ゆの量 (g)	豆腐の凝固率 ゆの透過率 (%)	官能評価
0	80	97.8	色調が改善される
1	75	97.9	
10	60	98.0	色調の改善と共に非常になめらかな 豆腐となる
50	50	98.0	
還元剤未処理 還元剤未処理 0	260	97.1	やや粉っぽくモロモロの凝固物

特開平2-257831 (11)

豆乳粉末を作る過程において、BTCaseを作用させることにより、市販豆腐粉に比べ、豆腐の凝固性を大幅に改善でき、また保水力も上昇した豆腐を作ることのできる豆乳粉末を得ることができた。またBTCase不使用の場合に比べ、凝固状態が改善された。

実施例3

全脂大豆フレーク（米国イリノイ州産大豆を剥皮後圧縮したもの）に9重量倍の水を加え、ミキサーにて攪拌し、大豆スラリーを得た。このものを100℃で2-3分加熱し、その後遠心分離機にてオカラを除去し豆乳を得た。

次にこの豆乳にタンパク1g当りBTCase(BTG-1比活性1100 U/g)を1, 10および50 Uとなる様、添加し、同時にL-アスコルビン酸ナトリウムを0.1重量%添加して、50℃にて30分間保持し、TGaseを作用させた。

この様にしてTGaseを作用させた豆乳を100℃で3-5分加熱し、冷却した。このものを噴霧乾燥（約160℃）することにより3種類の豆乳

特開平2-257831 (12)

豆乳粉末を作る過程において、BTGaseを作用させると同時に、還元剤を添加することにより、非常に保水力の高い豆腐を作ることのできる豆乳粉末を得ることができた。

実施例4

実施例2で得られた豆乳粉末および実施例3で得られた豆乳粉末の内、BTGase処理10 U/g・タンパクのものをそれぞれ60gとり、水940gを加えてミキサーにて溶解した。その後、これらを80℃まで加熱して0.4重量%となる様、少量の水で溶いた硫酸カルシウムを加えて10分間静置した。

このものを木綿さらし布を敷いた豆腐型箱に流し込み、重石をのせて20分水切りをして、ゆを除き豆腐を得た。

上記方法で調整した豆腐と、実施例2、3の方法で調整した豆腐について実施例2の評価方法に基づいて評価比較した。

上記の結果を表-9にまとめて記す。

表-9

官能評価	豆乳の凝固率 ゆの透過率 (%)	豆腐の保水力 ゆの量 (g)	処理条件 加熱条件
非常になめらかで市販の豆腐と ほぼ同様の食感	98.1	240	実施例2 100℃
	98.1	190	80℃
	98.0	60	実施例3 100℃
	97.1	50	80℃
凝固せず保形性がない	63.2	270	市販豆腐粉 80℃

本発明の豆乳粉末を用いて豆腐を調整する場合、その凝固温度（通常70-80℃）まで加熱し、調整したものは、従来より行われている方法である100℃まで加熱してから70-80℃まで冷却する方法で調整したものと、品質的に全く差がなく、むしろ少し保水力は高くなり、非常になめらかな豆腐を得ることができた。

(発明の効果)

本発明の様に、植物性タンパク含有水溶液に適当な条件でTGaseを作用させることにより得た、植物性タンパク粉末は、そのゲル化能が改善され、また色調・味・風味も改善されたものであった。

この植物性タンパク粉末はもちろん、その用途は前述の様な魚肉・畜肉製品への使用に限られるものではない。その使用に特に支障がなく、その機能を活用出来る限りは、一般食品工業に優れた用途を有する。

さらに、この植物性タンパクが大豆タンパクである場合、本発明の豆乳粉末から得た豆乳で、通常の方法と全く同じに、また凝固温度(70-80℃)

まで加熱するだけで、容易に保水力の高いなめらかな豆腐を得ることができる。

特許出願人 味の素株式会社

特開平2-257831 (13)

第1頁の続き

⑦発 明 者 土 屋 俊 浩 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
研究所内

HIS PAGE BLANK (c) 1963